

**Efecto de pasteurización y almacenamiento en
la estabilidad química y antioxidante de jugo
de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)**

Gustavo Andrés Reyes García

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de pasteurización y almacenamiento en la estabilidad química y antioxidante de jugo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Gustavo Andrés Reyes García

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Efecto de pasteurización y almacenamiento en la estabilidad química y antioxidante de jugo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)

Presentado por:

Gustavo Andrés Reyes García

Aprobado:

Jorge A. Cardona, Ph.D.
Asesor principal

Luis F. Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria.

Francisco J. Bueso, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto de pasteurización y almacenamiento en la estabilidad química y antioxidante de jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)

Gustavo Andrés Reyes García

Resumen. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) es una fruta originaria de los bosques de Brasil. Esta fruta ha sido reconocida por tener alta capacidad antioxidante, debido a su alto contenido de diferentes polifenoles, principalmente antocianinas, los mismos que le dan un color rojo característico. El objetivo fue analizar los cambios fitoquímicos y de capacidad antioxidante en jugo de açai producidos por efectos de pasteurización y almacenamiento. Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y tres repeticiones. Se evaluaron tratamientos de pre y post pasteurización, y se evaluó el efecto de almacenamiento a 30 y 40°C por 30 y 60 días. Se evaluaron características de contenido de polifenoles, concentración de antocianinas, polimerización, capacidad antioxidante y color. Los análisis de color mostraron que la disminución en color tiene el mismo patrón que presentó la disminución de polifenoles-antocianinas. La pasteurización generó polimerización de antocianinas pero tuvo efecto conservativo en color ($P < 0.0001$) y contenido de polifenoles ($P = 0.002$). Las condiciones de almacenamiento afectaron contenido de polifenoles y capacidad antioxidante. Las antocianinas mostraron gran sensibilidad (23% de reducción) en condiciones de almacenamiento ($P < 0.0001$), siendo los tratamientos a 60 días y 40°C los más influyentes. Cianidina-3-rutinósido se presentó en mayor cantidad que cianidina-3-glucósido y presentó mayor sensibilidad a temperatura de almacenamiento especialmente a 40°C. Se debe controlar la temperatura de almacenamiento en jugo de açai (menor a 30°C) para evitar pérdidas importantes de los compuestos de interés, deterioro en color y capacidad antioxidante.

Palabras clave: Antocianinas, polifenoles, polimerización.

Abstract. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is a fruit originated from the forests in Brazil. This fruit has been recognized for having high antioxidant capacity, due its high content of different polyphenols, mainly anthocyanins. These compounds give the fruit its characteristic red color. The objective of this study was to analyze the phytochemical and antioxidant capacity changes in açai juice, produced by pasteurization and storage conditions effects. A completely randomized statistical design consisting in six treatments with three replications was used. The treatments evaluated were pre and post pasteurization, and the effect of storage at 30 and 40°C for 30 and 60 days. Total soluble polyphenols, anthocyanin concentration, polymerization, antioxidant capacity and color characteristics were evaluated. Color analysis showed that color decrease had the same pattern as polyphenols-anthocyanins content decrease. Pasteurization generated anthocyanin polymerization but had a conservative effect in color ($P < 0.0001$) and polyphenol content ($P = 0.002$). Storage conditions affected the polyphenol content and antioxidant capacity of the açai juice. Anthocyanin showed to have great sensibility (23% of reduction) at storage conditions ($P < 0.0001$), being the treatments at 60 days and 40°C the most influential. Cyanidin-3-glucoside was present in more quantity than cyanidin-3-rutinoside and showed more sensibility to storage temperature, especially at 40°C. It is important to control the storage temperature for açai juice (less than 30°C) to avoid important losses of the compounds of interest, color and antioxidant capacity deterioration.

Keywords: Anthocyanins, polymerization, polyphenols.

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Página de firmas	ii
	Resumen.....	iii
	Contenido.....	iv
	Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1	INTRODUCCIÓN	1
2	MATERIALES Y MÉTODOS	3
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4	CONCLUSIONES	18
5	RECOMENDACIONES	19
6	LITERATURA CITADA.....	20
7	ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Contenido de cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido.....	12

Figuras	Página
1. Resultado Contenido de polifenoles totales en jugo de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento, expresado en μmol equivalente de ácido gálico/ml.	9
2. Concentración de antocianinas en tres fracciones químicas de jugo de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento, expresada en eq-mg/kg de cianidina-3-glucósido.....	10
3. Cromatograma de muestra analizada en HPLC, mostrando los picos de las dos antocianinas predominantes en açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) expuestas a diferentes tratamientos.....	11
4. Densidad de color de tres fracciones químicas (Polifenoles solubles totales, solo antocianinas y NAP=Parte sin antocianinas) en jugo de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento.	13
5. Valores de matiz de muestras de tres fracciones químicas de jugo de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento.	14
6. Porcentaje de monómeros de las muestras de tres fracciones químicas de jugo de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento	15
7. Cromatogramas analizados en HPLC, de las dos antocianinas predominantes en açai, expuestas a diferentes tratamientos.....	16
8. Capacidad antioxidante de tres fracciones químicas de jugo de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento	17

Anexos	Página
1. Empaque tetra-prisma (Tetra-pak [®]).....	23
2. Separación de fases en proceso de extracción con acetato de etilo.	23
3. Resumen de ANDEVA de análisis realizados a tres fracciones químicas de jugo clarificado de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).	24

1. INTRODUCCIÓN

Euterpe oleracea es una palma de rivera perenne originaria de la Amazonía que crece principalmente en los bosques lluviosos de Brasil y los países que se encuentran al norte de este particularmente Surinam y las Guayanas (Watson y Preedy 2010). Los frutos son de forma redonda y color púrpura oscuro, miden alrededor de 1.4 cm de diámetro y son cosechados, en su mayoría, entre los meses de julio y diciembre (Rogez 2000). La pulpa comestible de açai es comúnmente macerada con agua para producir una bebida espesa, morada, de textura cremosa y apariencia aceitosa con un sabor característico. Debido a la naturaleza altamente perecible de esta fruta, su consumo y comercialización, durante mucho tiempo, ha sido restringido a un nivel regional, limitado a Brasil (Schauss 2009), ahora ha aumentado el interés internacional y una expansión en su distribución han hecho que esta pulpa de açai sea accesible para el público en general en otros países. (Schauss *et al.* 2006).

En los últimos años se ha observado un estable incremento en el fomento de los colorantes naturales de las frutas y de las fuentes de alimentos funcionales, no solamente por el interés de consumir colorantes naturales sino por los beneficios relacionados a la salud y las propiedades nutraceuticas que su consumo conlleva (Del Pozo Insfran *et al.* 2004). El interés que esta fruta presenta es debido a su alto contenido de antocianinas y a sus altas capacidades antioxidantes (Rodrigues *et al.* 2006). La fruta de açai contiene altas cantidades de antocianinas, un grupo de polifenoles que le dan a dicha fruta su característico color púrpura oscuro y contribuyen con su capacidad antioxidante. Cianidina-3-glucósido, cianidina-3-diglicósido y cianidina-3-rutinósido son los tres principales antioxidantes encontrados en esta fruta (Ulbricht *et al.* 2012).

El consumo diario de polifenoles de fuente natural ha sido sugerido para contribuir a la prevención de algunas enfermedades crónicas incluyendo hiperlipidemia, enfermedades cardiacas y cáncer (Del Pozo Insfran *et al.* 2006). Varios compuestos, que se encuentran en açai en cantidades superiores que en muchas otras frutas, han demostrado tener efectos no sólo relacionados con la capacidad antioxidante sino también con la habilidad de regular otras funciones fisiológicas relacionadas con la supresión de cáncer, como actividad anti-mutagénica, inhibición de enzimas e inducción a su detoxificación (Galvano *et al.* 2004; Spencer 2004). En resumen, la fruta de açai tiene varias propiedades, farmacocinéticas y farmacológicas de sus metabolitos bioactivos que ayudan a la prevención de ciertas enfermedades crónicas (Heinrich *et al.* 2011). Heinrich *et al.* (2011), también concluyó que a pesar de que se ha demostrado que açai es uno de los más reconocidos nutraceuticos de la década, aún hay una falta de evidencia científica que permita promover a esta fruta y sus productos como excepcionales suplementos para la salud.

La fruta de açai es considerada de alta perecibilidad, por lo que requiere de cuidado especial durante la cosecha, post-cosecha, y el procesamiento del jugo que debe tener buenos procesos de extracción y buenas prácticas de manufactura para asegurar la calidad de la bebida y la seguridad del consumidor (Oliveira *et al.* 2011). Se ha reportado transmisión de mal de Chagas y otras enfermedades de transmisión alimenticia debido al consumo de productos derivados de açai (Pereira *et al.* 2009). El jugo de açai que no se somete a proceso de pasteurización no presenta los requerimientos higiénico-sanitarios necesarios para su consumo seguro y que la pasteurización puede reducir la carga microbiana para poder ofrecer un producto seguro y de calidad (Oliveira *et al.* 2011). Sin embargo, al realizar dicho proceso térmico puede haber variación de algunas características físico-químicas del jugo de açai, como sólidos totales (aumentos reportados de hasta 16.14%) y contenido de proteínas (disminución de hasta 6.14%) con tratamientos de pasteurización a 80 y 90°C por 2 minutos (Oliveira *et al.* 2011). A su vez, Pacheco-Palencia *et al.* (2007a) concluyó que la estabilidad polifenólica antioxidante y de color del jugo de açai depende de las interacciones entre los componentes de la matriz y son influenciados por el procesamiento, almacenamiento, temperatura y composición química, reportándose aumentos del 4.3% en la tasa de reacción de antocianinas al alterar la matriz química del jugo realizando fortificaciones con ácido ascórbico. También mencionó que el deterioro en color de los productos que contienen antocianinas se da no sólo por la degradación de antocianinas sino también por la transformación de antocianinas monoméricas en formas con mayor peso molecular o polímeros (Polimerización).

En este estudio, se analizaron los cambios físico-químicos que ocurran en el contenido de polifenoles, la capacidad antioxidante, concentración de antocianinas y cambios de color en açai, antes y después de pasteurización y al jugo pasteurizado se le analizará en diferentes condiciones extremas de almacenamiento (tiempo y temperatura) para inducir deterioro.

Los objetivos del estudio fueron:

- Establecer los cambios en contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de jugo de açai expuesto a pasteurización y almacenamiento a 30 y 40°C durante 30 y 60 días.
- Evaluar la estabilidad de color y polimerización en jugo de açai expuesto a pasteurización y almacenamiento a 30 y 40°C durante 30 y 60 días.
- Determinar la sensibilidad a la pasteurización y almacenamiento (30 y 40°C por 30 y 60 días) de las dos principales antocianinas presentes en açai.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. La bebida se realizó con fruta producida en la región norte de Brasil por la compañía Sambazon®. El producto fue enviado a Estados Unidos y se almacenó congelado en cuartos fríos del departamento de Nutrición y Ciencia de Alimentos en Texas A&M University, College Station, Texas-Estados Unidos. Las fases experimentales del estudio se realizaron en el laboratorio de Fito-química del Centro de Investigación de Frutas y Vegetales del Departamento de Nutrición y Ciencia de Alimentos en Texas A&M University, Texas-Estados Unidos.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con seis tratamientos y tres repeticiones, dando un total de 18 unidades experimentales.

Descripción de los tratamientos. El primer tratamiento lo constituyó el jugo de açaí previo al proceso de pasteurización (Pre-past). El segundo tratamiento fue el jugo de açaí pasteurizado y empacado en envase Tetra-prisma (Tetra-pak®) y evaluado antes del proceso de almacenamiento (D0). Los siguientes cuatro tratamientos fueron jugo pasteurizado y empacado sometido a diferentes condiciones para inducir deterioro en incubadoras a 30 y 40°C por 30 y 60 días (D30-30°C, D30-40°C, D60-30°C, D60-40°C). Después de realizar el respectivo tratamiento el jugo fue sometido a una clarificación. Posteriormente, a cada tratamiento se le realizaron tres fracciones químicas: Polifenoles totales (PT), sólo antocianinas (ANT) y otros polifenoles (OP). Estas fracciones constituyeron las variables respuestas del estudio.

Clarificación del jugo de açaí. El jugo de açaí tenía fibra, grasa y otros sólidos no solubles que podían causar variación en los análisis realizados. Se clarificó para eliminar estos elementos no deseados para el análisis y obtener un jugo ópticamente claro. Para cada tratamiento se sometieron 975 mL de jugo. Se centrifugó en varios tubos Falcon de 50 mL a 3500 rpm por ocho minutos, y se eliminó el precipitado. Se repitió este procedimiento tres veces. Se filtró a través de polvo de diatomeas (Celite 545®), utilizando filtros de papel Fisher Scientific® Q8 y una bomba de vacío. Se mezcló con acetona en proporción 1:1 para precipitar los sólidos no solubles y luego se realizó de nuevo el filtrado con polvo de diatomita. Se evaporó la acetona en el evaporador rotatorio Buchi® Rotovapor II a temperaturas entre 50°C y 60°C, ya que en a temperaturas mayores a 70°C hay una rápida degradación de antocianinas y otros compuestos fenólicos (Havlíková y Miková 1985), y por último se agregó agua hasta regresar al volumen inicial de antes del mezclado con acetona.

Extracción con acetato de etilo. (Elaboración de fracciones del jugo). Se realizaron diferentes extracciones de este jugo clarificado: Para la fracción PT se utilizó el jugo clarificado tal y como está. Se utilizaron alícuotas de 5 mL para realizar los análisis. Por otro lado, el jugo clarificado se sometió a extracciones con acetato de etilo para separar la fracción ANT de OP, esto debido a la insolubilidad de las antocianinas con este solvente. Se utilizaron alícuotas de 5 mL del jugo clarificado mezclados con 3 mL de acetato de etilo en tubos de ensayo. Se agitó y dejó reposar por varios minutos, el acetato de etilo con la fracción OP fue succionado con pipetas pasteur. Se repitió tres veces el mismo proceso en cada muestra para asegurar una extracción efectiva. Se evaporó los residuos de acetato de etilo en la fracción ANT, y después de la evaporación, se agregó agua para volver a su volumen inicial (5 mL). La fracción OP fue filtrada a través de sulfato de sodio para remover agua residual y posteriormente se evaporó el acetato de etilo mediante evaporación rotatoria a 45°C. La fracción OP fue re-disuelta en 2.5 mL de agua des ionizada (concentración 2X).

Contenido total de polifenoles solubles. Se utilizó el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965). En este ensayo se midió la capacidad total reductora de una muestra, como medida de concentración de polifenoles. Para el ensayo se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (0.25 N) como fuente de iones metálicos oxidativos, y una solución de carbonato de sodio (1 N). Se agregó 0.1 mL de la muestra en tubos de ensayo y a este se agregó 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.25 N, se agitó y dejó reposar por tres minutos. El extracto redujo los iones metálicos en la medida de su contenido de polifenoles. Luego, se agregó 1 ml de carbonato de sodio, se agitó nuevamente y dejó reposar por siete minutos. El carbonato de sodio fue agregado para reducir el pH produciendo una coloración azul. Posteriormente, se agregó 5 ml de agua, se agitó y dejó reposar por dos horas. Finalmente se agitó y se midió absorbancia en el espectrofotómetro a 726 nm. Este procedimiento se realizó para cada repetición. Se aplicó el mismo procedimiento para realizar una curva estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones utilizando diferentes cantidades conocidas de ácido gálico en lugar de muestra de jugo de açaí. Se registraron los datos de absorbancia de cada muestra y se realizó un ajuste con la pendiente de la curva estándar de ácido gálico para obtener un valor final de concentración de polifenoles. A los valores de la curva estándar se les sacó la pendiente. Con estos valores se utilizó una fórmula [1] que permitió calcular la concentración de polifenoles. Los datos se reportaron como mg/kg de equivalente de ácido gálico.

$$\text{Concentración}_{ppm} = \frac{Abs_{726}}{Pendiente} * \text{Factor de dilución} \quad [1]$$

Concentración de antocianinas. Se utilizó el método de determinación espectrométrica a 520 nm, según el método de diferencial de pH (Wrolstad *et al.* 2005). Para este ensayo se utilizaron dos buffers: pH 1.0 y pH 4.5. Se preparó una solución de 0.5 mL de muestra diluida en 4.5 mL de buffer pH 1.0, el mismo proceso con el buffer pH 4.5. Se hizo un blanco con cada uno de los buffers. Se dejó reposar por dos horas en oscuridad. Se leyó absorbancia a 510 nm y a 700 nm para cada uno de los buffers. Con las respectivas medi-

das de absorbancia se aplicó la ley de Beer-Lambert para el cálculo de concentración de antocianinas. Primero, se hizo un cálculo de absorbancia ajustada relacionando los cuatro valores de absorbancia obtenidos para cada muestra con la ecuación [2]. Posteriormente, se calculó la concentración en mg/kg con la ecuación [3] que relaciona la absorbancia ajustada obtenida, un factor de ajuste dilución/concentración, y un coeficiente de extinción molar para antocianinas (Jurd y Asen 1996). Los resultados se expresaron en equivalentes de cianidina-3-glucósido (mg/L).

$$Abs. \text{ ajustada} = (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH1.0} - (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH4.5} \quad [2]$$

Cálculo de concentración de antocianinas:

$$Concentración \left(\frac{mg}{kg} \right) = \left(\frac{Absorbancia \text{ ajustada}}{coeficiente \text{ de extinción molar}} \right) * PM * 1000 * 10 \quad [3]$$

PM (Peso molecular) = 457.6 g/mol de cianidina-3-glucósido.

Coficiente de extinción molar = 29600 -cianidina-3-glucósido.

1000 es el factor de conversión de molar a ppm (mg/kg).

10 es el factor de dilución de la muestra en el buffer (0.5 mL en 4.5 mL).

Estabilidad de color. Se realizaron análisis de espectroscopía de luz visible para determinar la intensidad de color y de matiz de las muestras clarificadas (Wrolstad *et al.* 2005). La intensidad de color o saturación es qué tan alejado está un color del gris (Yeshayahu y Clifton 1994). Para este análisis se midió mediante la absorbancia de los tres componentes básicos del color: A_{420} para el amarillo A_{520} para el rojo y A_{700} para el azul. Se mezcló 0.5 mL de muestra con 4.5 mL de buffer pH 3.0 (9.24 g de ácido cítrico y 1.91 g de hidróxido de sodio disueltos en 1 L de agua, y se ajustó a pH 3.0). Después se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 420, 520 y 700 nm. Se apuntó los valores y se utilizó la fórmula [4] para el cálculo del valor final de densidad de color. El matiz expresó que tan roja o que tan café era una muestra. Para este análisis se utilizaron los valores de absorbancia registrados para el ensayo de Densidad de Color los cuales fueron aplicados a la ecuación 5 para obtener los valores finales de matiz.

$$Densidad \text{ de color} = (Abs_{520} - Abs_{700}) + (Abs_{450} - Abs_{700}) \quad [4]$$

$$Matiz = \frac{(Abs_{420} - Abs_{700})}{(Abs_{520} - Abs_{700})} \quad [5]$$

Porcentaje de monómeros/polímeros. Se utilizó el ensayo de medición de resistencia de antocianinas a la decoloración con sulfito de sodio (Na_2SO_3) por medio de espectroscopía de luz visible (Rodríguez *et al.* 1999). Este ensayo expresó el porcentaje de monómeros y polímeros de cada muestra. En dos tubos de ensayo, por duplicado, se hizo una solución de 0.3 mL de muestra en 2.7 mL de buffer pH 3.0. Se leyó absorbancia a 520 nm. Después a uno de los tubos se añadió 200 μL de sulfito de sodio y al otro, se añadió 200 μL de agua para registrar este valor como blanco, se dejó reposar por tres minutos para después leer nuevamente la absorbancia a 520 nm. Se registró los valores y se utilizó las ecuaciones [6] y [7] para el cálculo de monómeros y polímeros:

$$\%Polímeros = \left(\frac{Abs_{SO_2}}{Abs_{blanco}} \right) * 100 \quad [6]$$

$$\%Monómeros = \left(\frac{Abs_{blanco} - Abs_{SO_2}}{Abs_{blanco}} \right) * 100 \quad [7]$$

Capacidad de absorbancia de radicales (ORAC). Se utilizó el ensayo ORAC adaptado para trabajar con un espectrofotómetro de fluorescencia Molecular Devices fmax® (485 nm de excitación y 538 nm de emisión) y un micro-plato de 96 celdas (Talcott *et al.* 2003). Primero, se elaboró una solución a 200 μM que contenía la molécula ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilclorman-2-carboxílico (Trolox) que era la base comparativa, con la que se hizo la curva estándar. Se realizó también una solución de 10 mg de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH – “azo-indicador”) Waco Chemicals® en 10 mL de buffer fosfato, este fue la fuente de radicales peróxido, es decir el inductor de oxidación. El indicador que se usó fue la molécula Fluorescina (ácido libre) Sigma Chemical®. Se diluyó 15 μL , de una solución stock de 50 nM, en 50 mL de buffer fosfato. Se utilizaron las 96 celdas de los platos para hacer varias lecturas de los seis tratamientos de las muestras de las tres fracciones, el blanco, y la curva estándar en una sola corrida. Se realizó una corrida por repetición. En el plato se utilizaron 12 celdas para blancos y se hicieron dos curvas estándar con seis diferentes concentraciones de Trolox (50, 25, 12, 6, 3 y 1.5 μM). Para pipetear cada celda se utilizó 50 μL de muestra. Se puso la Fluorescina y el AAPH en contenedores conectados a las mangueras alimentadoras del espectrómetro de fluorescencia, este inyectó 50 μL de AAPH y 100 μL de solución de Fluorescina en cada celda del micro-plato y registró la absorbancia de cada plato cada dos minutos durante 70 minutos. Los datos de absorbancia de cada tiempo se registraron y se utilizó una plantilla en Excel creada para hacer un ajuste de la curva de absorbancia presentada por cada celda, la dilución, los blancos y la curva estándar para presentar la absorbancia de la muestra en cada celda. Los datos se reportaron como mili equivalentes de Trolox por mL de muestra.

Análisis cromatográfico. Este análisis se realizó únicamente a la fracción PT. Las muestras de jugo clarificado se filtraron a través de micro filtros de 0.45 μm y se almacenaron

en viales de 1.5ml. Las muestras se analizaron en HPLC de fase reversa usando condiciones cromatográficas modificadas (Talcott y Lee 2002) con equipo Alliance Waters 2695 (Waters Corp., Mildfold, MA) equipado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Waters 996. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna Acclaim 120-C18 de 250 × 4.6 mm (Dionex, Sunnyvale, CA) con una columna guardia C18. Las fases móviles consistieron en agua (fase A) y una solución metanol-agua 60:40 (fase B), ambas fueron ajustadas a pH 2.4 con ácido *o*-fosfórico. El programa de gradiente del solvente corrió la fase B de 0% a 60% en 20 minutos; de 60% a 100% en 20 minutos, 100% por 7 minutos; de 100% a 0% en 3 minutos y las condiciones finales fueron mantenidas por 2 minutos a un flujo de 0.8 mL/minuto. Los compuestos fueron identificados por interpretación espectral UV/VIS, tiempo de retención y comparación con estándares auténticos (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Se realizó una curva estándar con cianidina-3-glucósido. Los resultados obtenidos en abundancia relativa fueron ajustados con la pendiente de la curva realizada y los datos se reportaron como mg-cianidina-3-glucósido / kg.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SAS[®] “Statistical Analysis System”. Se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) con una significancia del 95%. A cada muestra se le realizaron tres fracciones químicas, estas fracciones constituyeron las variables respuesta. Se realizó una separación de medias Duncan para determinar las diferencias cuantitativas de estabilidad química, antioxidante y de color del jugo de açaí sometido a los diferentes tratamientos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El jugo de açai resultó ser una matriz difícil para trabajar, por esta razón se clarificó para posteriormente hacer las fracciones químicas y los ensayos. Se debe considerar que la clarificación con polvo de diatomeas pudo ocasionar cierta disminución en el contenido de polifenoles, especialmente antocianinas (Pacheco Palencia *et al.* 2007b). Se encontraron diferencias estadísticas en todos los parámetros evaluados, pero no siempre para todos los tratamientos.

Polifenoles totales. Se realizó el ensayo de polifenoles totales conocido como Folin's. Los resultados de cada fracción se analizaron por separado y se encontró diferencia estadística ($P < 0.0001$) para las tres fracciones (Figura 1). Los datos presentados son los promedios de los resultados de la aplicación de los valores obtenidos de espectrometría en la Ecuación [1]. Se observó un patrón similar para dos de las fracciones evaluadas (PT y ANT). En un estudio similar se mostró que no había diferencia estadística en la fracción de polifenoles de açai que no contenía antocianinas, y las diferencias encontradas se atribuyeron a las procianidinas y al ácido *p*-coumárico, el resto de polifenoles permanecieron sin cambios (Pacheco Palencia *et al.* 2007b).

En el análisis realizado en el presente estudio, en la fracción OP, se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0037$) entre los tratamientos, que pudo deberse a las procianidinas y ácido *p*-coumárico y también a cierta presencia de antocianinas que quedaron en esta fracción (Figura 2).

Se le atribuyó un efecto conservativo a la pasteurización ya que los valores de contenido de polifenoles solubles totales para el tratamiento de pre-pasteurización fueron inferiores que los del tratamiento de post-pasteurización (Día 0), esto pudo haberse debido a cierta disminución del contenido de polifenoles y antocianinas debido a que el jugo estuvo almacenado en condiciones de congelación durante siete meses antes de realizarse el estudio. También pudo haber existido una reducción en el contenido de polifenoles debido a que ciertos compuestos se quedan adheridos al filtro de polvo de diatomeas durante el proceso de clarificación, estudios previos han demostrado que ha existido pérdida de contenido de polifenoles totales por clarificación y hubo correlación con similares pérdidas de contenido de antocianinas totales (Pacheco Palencia *et al.* 2007b).

Para la fracción PT en el tratamiento Pre-past hubo menor contenido ($p < 0.0001$) de polifenoles 566.809 ± 19.424 mg-eq de ácido gálico comparado con el contenido de 634.813 ± 14.008 mg-eq de ácido gálico presentado en el tratamiento Día 0, mientras que para la fracción ANT no se presentaron diferencias entre estos dos tratamientos, esto se atribuyó

a que pese al efecto que tuvo la pasteurización en conservar el contenido polifenólico, pudieron darse reacciones de polimerización ocasionadas por el mismo proceso térmico de pasteurización.

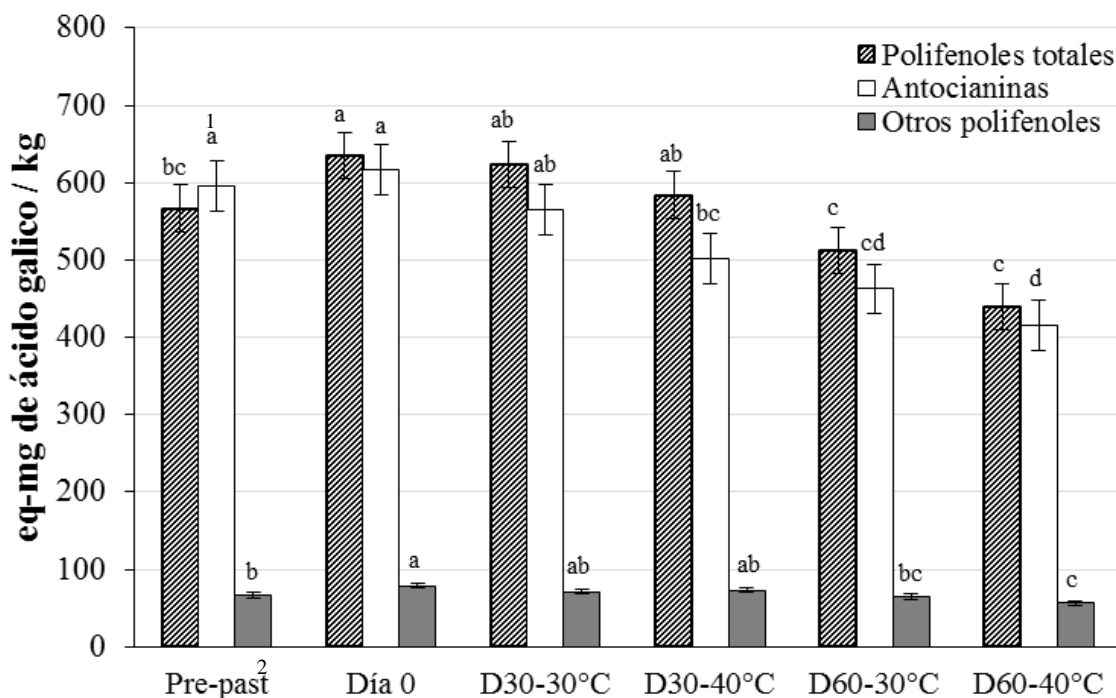


Figura 1. Resultado Contenido de polifenoles totales en jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento, expresado en μmol equivalente de ácido gálico/ml.

¹Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Día0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C.

Las pérdidas en el contenido total de polifenoles durante el almacenamiento se atribuyeron a la polimerización y oxidación ocurridas. Los polifenoles reducen el número de grupos hidroxilo que es lo que mide el análisis de Folin-Ciocalteu (Klopotek *et. al* 2005), sin embargo, muchos de estos polifenoles alterados por oxidación o polimerización poseen aún capacidad reductora de metales y por lo tanto pueden ser detectados en el ensayo (Talcott y Howard 1999). Polifenoles (antocianinas) aún polimerizados incluso pueden seguir teniendo capacidad reductora. Por lo tanto, el análisis de Folin-Ciocalteu no mostró enteramente las complejas variaciones en los polifenoles que pudieren existir en la matriz del alimento durante las condiciones de almacenamiento, como la polimerización de antocianinas, pero mostró un patrón de la afección al contenido de polifenoles causado por las condiciones de cada tratamiento. La concentración de polifenoles presentes en la fracción OP fueron mucho menores que en la fracción ANT, lo que indicó que la mayoría de los polifenoles presentes en açai eran antocianinas.

Concentración de Antocianinas. Para este ensayo la fracción que más variación presentó fue ANT, debido que esta fracción era un extracto de sólo antocianinas (Figura 2). La fracción OP mostró contenido de antocianinas, pudieron ser cianidinas, procianidinas, pelargonidinas o polímeros de estas que pueden responder ante el análisis espectrométrico a cambio de pH, se atribuyó a que la separación realizada no fue totalmente efectiva, ya que pudo haber cierta asociación de antocianinas con otros polifenoles o que ciertas antocianinas quedaran atrapadas en el solvente utilizado (Pacheco Palencia *et al.* 2007b). Las variaciones en PT se atribuyeron a la presencia de antocianinas, pues se observaron más diferencias estadísticas entre los tratamientos en ANT que en PT (Figura 3) y se ha mencionado que las antocianinas son la parte más variable o sensible al deterioro térmico (Havlikova y Mikova 1985).

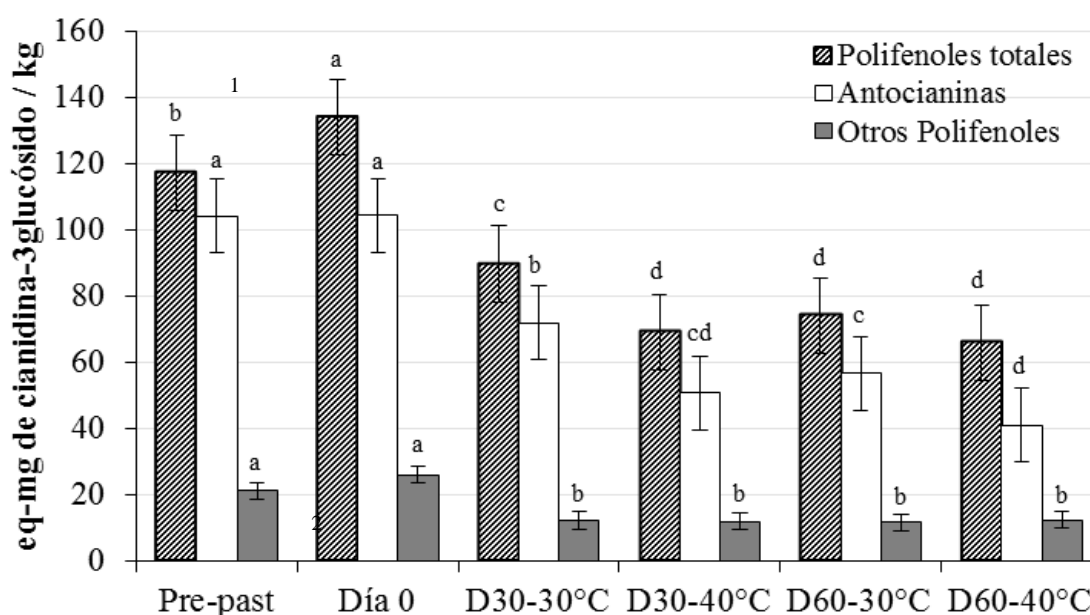


Figura 2. Concentración de antocianinas en tres fracciones químicas de jugo de açái (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento, expresada en eq-mg/kg de cianidina-3-glucósido.

¹Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Day0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C.

Hubo reducciones en el contenido de antocianinas debido a que algunas quedaron atrapadas en el filtro de polvo de diatomeas, se ha demostrado que se da hasta un 20% de reducción en la concentración de antocianinas por este motivo (Pacheco Palencia *et al.* 2007b). Se pudo apreciar que efectivamente hubo un efecto de los tratamientos al contenido de antocianinas de las muestras (Figura 2). Se observó, nuevamente, un efecto positivo de la pasteurización ante el deterioro por almacenamiento. Entre los tratamientos Pre-past y Día 0 existió mayor contenido de antocianinas del primero sobre el segundo en la fracción PT, mientras que en ANT no hubo diferencia significativa entre estos dos, esto se atribuyó a la polimerización presentada por las antocianinas debido a la pasteurización. La fracción

ANT presentó más deterioro que las otras, esto se atribuyó a que el análisis es para cuantificar la concentración de antocianinas, y en esta fracción es donde se encuentra la mayoría de estos compuestos. El tratamiento al día 60 y 30°C, en las fracciones PT y ANT, presentó resultados más altos en concentración de antocianinas que el tratamiento en 60 días a 40°C e incluso que el tratamiento en 30 días a 40°C, es decir, las antocianinas en este ensayo mostraron mayor sensibilidad al aumento de temperatura a 40°C que al tiempo de almacenaje. Esto atribuido a la sensibilidad de la cianidina-3-rutinósido a la temperatura expuesta ya que ante tratamientos térmicos, se ha reportado que presentó reducción en concentración y aumento en la tasa de reacción (Pacheco Palencia *et al.* 2007b), también esta molécula se encuentra en mayor cantidad que cianidina-3-glucósido (Figura 3). Estas son las dos antocianinas predominantes en açai (Pacheco Palencia y Talcott 2010).

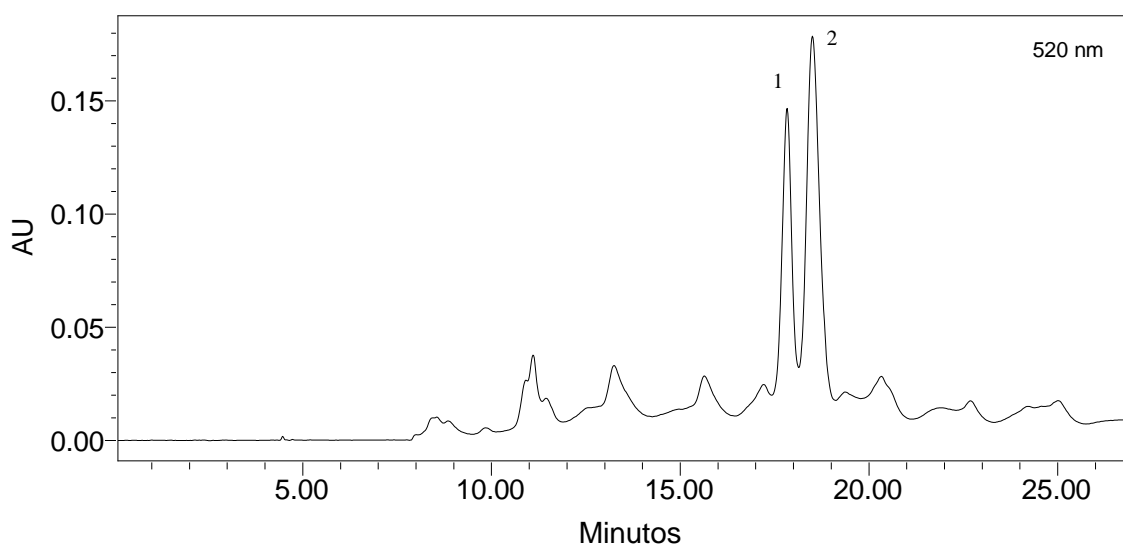


Figura 3. Cromatograma de muestra analizada en HPLC, mostrando los picos de las dos antocianinas predominantes en açai (*Euterpe oleracea* Mart.) expuestas a diferentes tratamientos.

¹Cianidina-3-glucósido. ²Cianidina-3-rutinósido

Se realizaron análisis cromatográficos en HPLC de fase reversa para cuantificar el contenido de cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido, (Cuadro 1) que son las antocianinas predominantes en açai (Pacheco Palencia y Talcott 2010). Los picos mostraron un tiempo de retención entre 16 y 17 minutos (Figura 3). Se observó que a diferencia de la fracción PT, la fracción ANT, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de Pre-past y Día 0 (Cuadro 1). Se mostró también, un decrecimiento del contenido cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido de la muestra del tratamiento Día 0 con respecto del tratamiento Pre-past (Cuadro 2), para estas dos antocianinas, la pasteurización pareció no tener un efecto contraproducente, a diferencia del resto de antocianinas y polifenoles en general, por esta razón no se muestran cambios entre estos dos tratamientos en el análisis de concentración de antocianinas (Figura 2). En los tratamientos de almacenamiento (30 y 60 días) la suma de las antocianinas individuales caracterizadas (Cuadro 2) es menor que el contenido de antocianinas totales (Figura 2), esto se atribuyó a la influencia de co-

factores naturalmente formados, los cuales afectan el color y pueden influir en el análisis, y a los polímeros de antocianinas que son reconocidos por el análisis de espectrometría (Del Pozo Insfran *et al.* 2004).

Cuadro 1. Contenido de cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido en jugo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento

Tratamiento	Cianidina-3-glucósido (mg-eq C3G ¹ /kg)	Cianidina-3-rutinósido (mg-eq C3G /kg)
Pre-Past ²	55.9 ± 5.55a ³	71.0 ± 4.84 ^a
Día 0	46.9 ± 3.17b	69.1 ± 5.72 ^a
D30-30°C	36.0 ± 3.36c	36.9 ± 4.49b
D30-40°C	11.0 ± 0.85d	20.6 ± 6.11c
D60-30°C	10.8 ± 1.06d	34.0 ± 5.21b
D60-40°C	9.51 ± 1.84d	15.0 ± 1.10c
CV%	13.4	14.5

¹C3G=Cianidina-3-glucósido. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Día0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C. ³Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa.

Cianidina-3-glucósido mostró encontrarse en mayor cantidad y ser más estable presentando una reducción ligeramente mayor que cianidina-3-rutinósido ante los tratamientos, concordando con los estudios de Del Pozo Insfran *et al.* (2004) y Pacheco Palencia *et al.* (2007b).

Estabilidad de color. Se realizó un análisis espectrofotométrico de las muestras, utilizando los datos obtenidos en las Ecuaciones [4] y [5] para obtener valores de densidad de color (Figura 4) y matiz (Figura 5). Para este ensayo, los datos revelaron un patrón similar al del ensayo de concentración de antocianinas, ya que estos compuestos son los responsables de dar el color rojo característico al açaí. Debido a esto, se obtuvo una mejor densidad de color para la muestra de jugo pasteurizado (Día 0) que para la muestra de jugo pre-pasteurizado. La densidad de color se vio afectada por los tratamientos de deterioro, en más cantidad por los tratamientos a 40°C. La parte OP no mostró cambios significativos de densidad de color debido a la poca coloración de esta fracción por su carencia de antocianinas. El patrón de densidad de color (Figura 5) fue similar al patrón de contenido de antocianinas. Se ha demostrado previamente que la presencia o concentración de antocianinas tiene correlación con la densidad o intensidad de color en alimentos con colores rojos (Del Pozo Insfran *et al.* 2004). Al observar los tratamientos Pre-past y Día 0 (Figura 5), se vio que la pasteurización no afectó negativamente al color. Este efecto también se atribuyó a asociaciones simbióticas (copigmentación) de las antocianinas con compuestos que sirven como cofactores y potencian el color (Del Pozo Insfran *et al.* 2004).

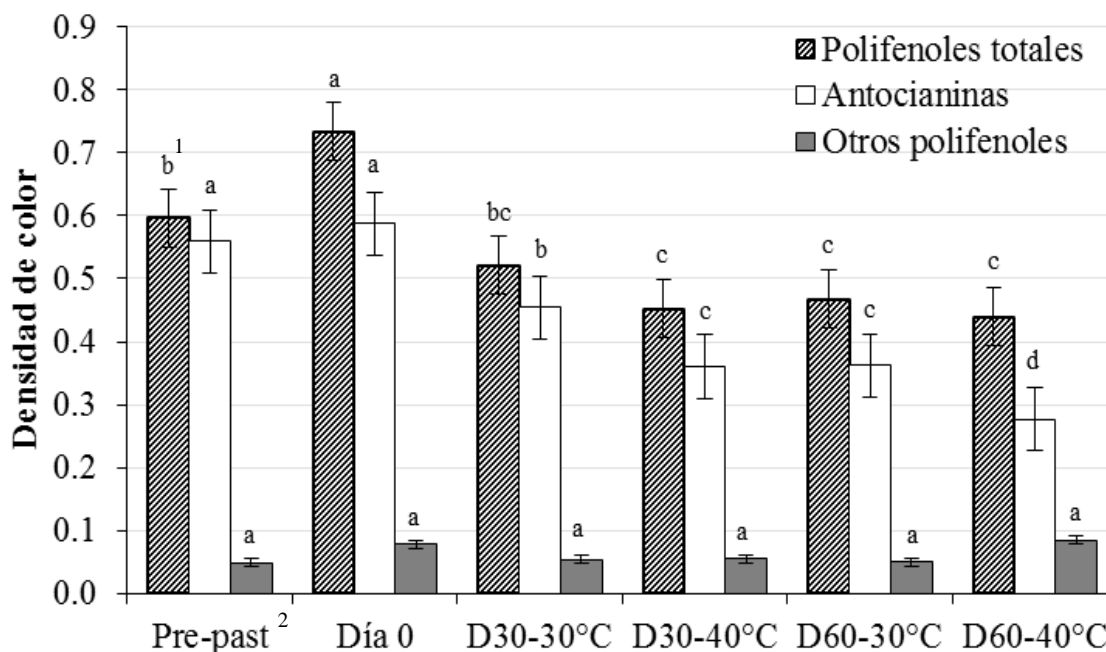


Figura 4. Densidad de color de tres fracciones químicas (Polifenoles solubles totales, solo antocianinas y NAP=Parte sin antocianinas) en jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento.

¹Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Day0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C.

Por otro lado, el valor de matiz mostró que tan amarillo o café fue el color presentado por las muestras (Figura 5). Mientras mayor era el valor del matiz, más coloración amarillenta y menos coloración roja tuvieron las muestras. Los valores presentados por las fracciones PT y ANT mostraron valores inferiores de matiz que la muestra OP, esto debido a que OP tenía menor contenido de antocianinas que son las que proporcionan el color rojo. Las fracciones PT y ANT presentaron diferencias ($P=0.0002$), y hubo aumento de matiz en los tratamientos. Las condiciones de almacenamiento ocasionaron un aumento de matiz, especialmente el almacenamiento a 40°C. Estos cambios se atribuyen a reacciones de polimerización, degradación y cofactorización ocurrientes en las antocianinas (Del Pozo Insfran *et al.* 2004). La fracción OP no presentó diferencia en el valor de matiz, y al igual que en otros análisis de color, presenta alta variación, esto se debe a que hay ciertas antocianinas presentes en esta fracción producto de un proceso de fraccionamiento menos efectivo. Por esta razón, el contenido de antocianinas en la fracción OP se mostró variable lo que ocasionó dicha variabilidad en el análisis de color.

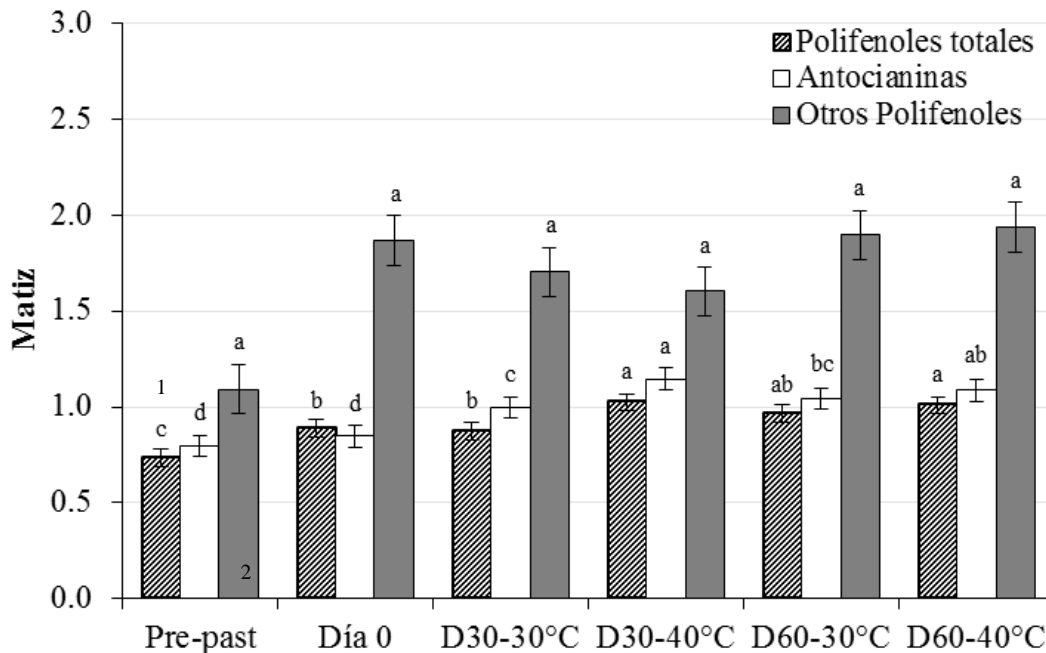


Figura 5. Valores de matiz de muestras de tres fracciones químicas de jugo de açái (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento.

¹Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Day0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C.

Polimerización de antocianinas. En este análisis no se analizaron contenidos absolutos de monómeros o polímeros obtenidos en cada muestra, sino el porcentaje de monómeros que cada muestra presentó después de ser sometidas a los tratamientos (Figura 6). Se observó que se dio una polimerización debido al proceso de pasteurización. Los resultados mostraron que la variación de las diferentes fracciones no fue igual, la fracción PT, en porcentaje mostró contener más compuestos antocianínicos polimerizados que la fracción de ANT, en la fracción OP se mostraron la mayor cantidad de polímeros de antocianinas, esto nos dijo que de las bajas concentraciones que tiene esta fracción, una buena cantidad están polimerizadas, esto nos reveló que estos compuestos polimerizados tendieron a migrar hacia en el solvente (acetato de etilo) en el proceso de fraccionamiento, siendo esta la que ocasionó mayormente el incremento en la variación en la fracción de polifenoles totales. Las antocianinas monoméricas son menos estables y tienden a polimerizarse, las poliméricas presentan mayor estabilidad. Esta polimerización puede darse de dos formas: copigmentación y polimerización con flavan-3-oles y procianidinas (Jensen *et al.* 2008). También se mostró que ANT fueron la fracción más sensible a la temperatura en almacenamiento (Figuras 1 y 3).

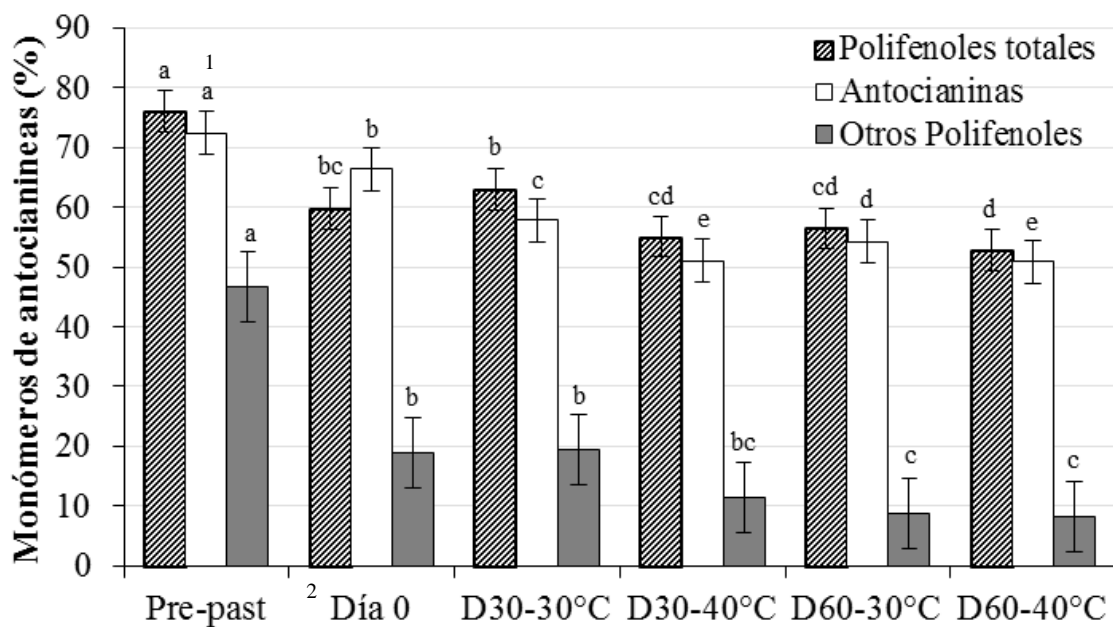


Figura 6. Porcentaje de monómeros de las muestras de tres fracciones químicas de jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento

¹Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Day0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C.

Las antocianinas, al igual que muchos de los polifenoles, son compuestos relativamente inestables y sensibles, susceptibles a numerosas reacciones de ‘deterioro’ durante procesamiento y almacenamiento (Wrolstad *et al.* 2005), cuando se encuentran en forma monomérica tienden a formar pigmentos oligoméricos y poliméricos, que son compuestos más estables, estos producen cambios a colores rojos pardos (Monagas *et al.* 2006). La polimerización se pudo observar visualmente en los cromatogramas (Figura 7) donde para los tratamientos Pre-past y Día 0 se pudo observar y reconocer con claridad las dos antocianinas (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido) mientras que para los tratamientos a 40°C y para los tratamientos de 60 días no se reconoce con claridad los picos y se nota asociación de los compuestos a los diferentes tiempos de retención.

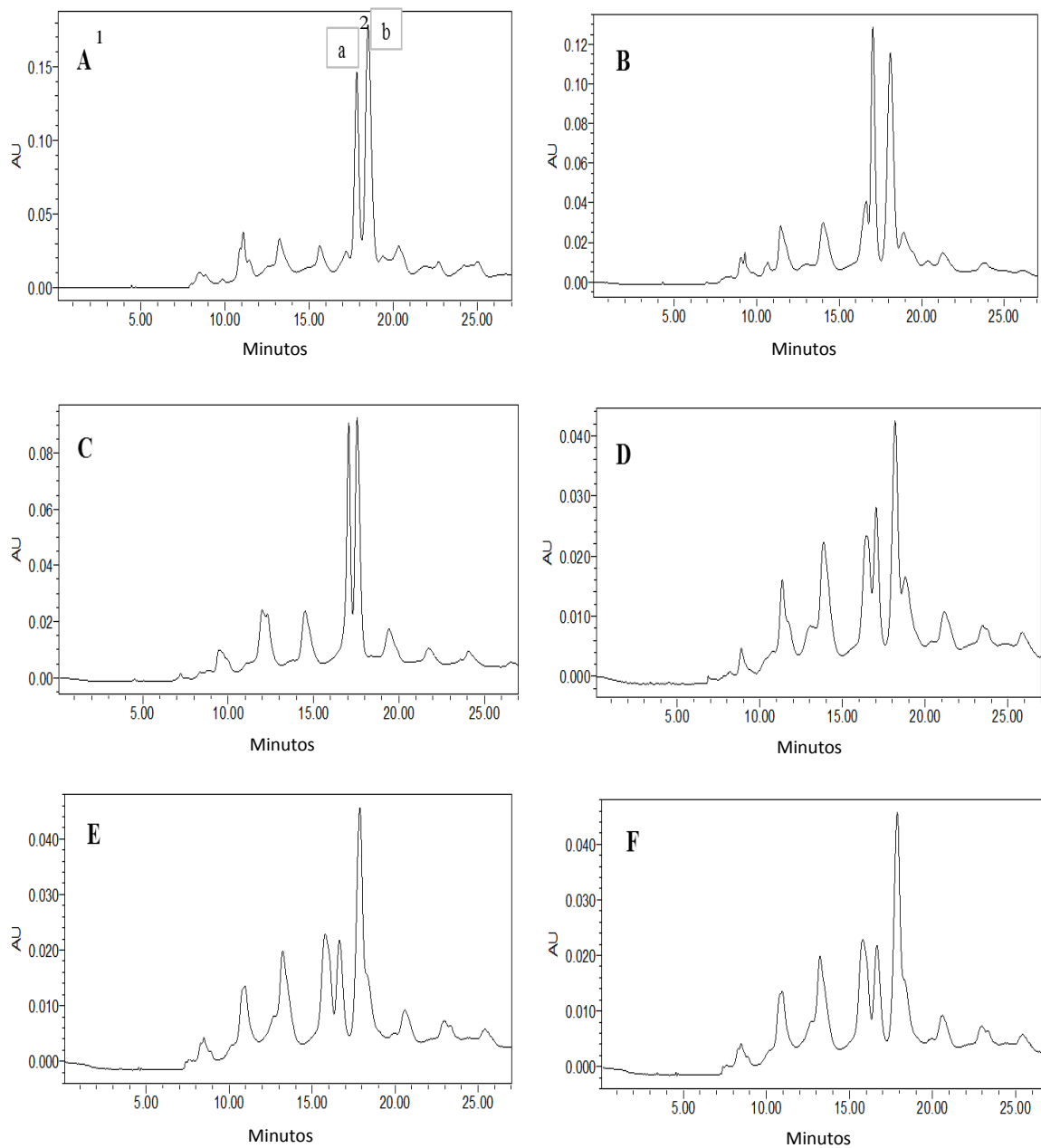


Figura 7. Cromatogramas analizados en HPLC, de las dos antocianinas predominantes en açai, expuestas a diferentes tratamientos.

¹A=jugo pre pasteurizado. B=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. C=jugo almacenado 30 días a 30°C. D=jugo almacenado 30 días a 40°C. E= jugo almacenado 60 días a 30°C. F= jugo almacenado 60 días a 40°C.
²a=cianidina-3-glucósido. B=cianidina-3-rutinósido.

Capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante mostrada por las muestras (Figura 8) fue inferior a la reportada por la pulpa de açai (Pacheco *et al.* 2007b), esto debido a que las muestras analizadas se encuentran diluidas 4 veces en contenido de açai (25% de pulpa utilizada para preparar la bebida) y también hay cierto deterioro por la clarificación utilizando polvo de diatomeas. La capacidad antioxidante de las muestras a sometidas a los tratamientos de almacenamiento tuvieron una tendencia similar a la del análisis de contenido de polifenoles totales. La fracción OP mostró una capacidad antioxidante notablemente menor que las otras dos fracciones, esto se atribuyó al bajo contenido de polifenoles que esta fracción tenía, mas no a que los compuestos que esta fracción contenía tuvieran baja capacidad antioxidante. La fracción OP no mostró diferencias significativas entre tratamientos, esto puede ser debido al ya mencionado bajo contenido de polifenoles de esta muestra con respecto a las demás. La fracción ANT es la que mostró el mayor deterioro, esto se atribuyó a que las antocianinas demostraron ser los compuestos con mayor sensibilidad a las condiciones de almacenamiento (hasta 23% de reducción). En este ensayo no se analizó la capacidad antioxidante que tienen las antocianinas, o los otros polifenoles ni se compararon estos valores, lo que se midió fue la capacidad antioxidante de cada muestra, es decir, de cada fracción a los diferentes tratamientos

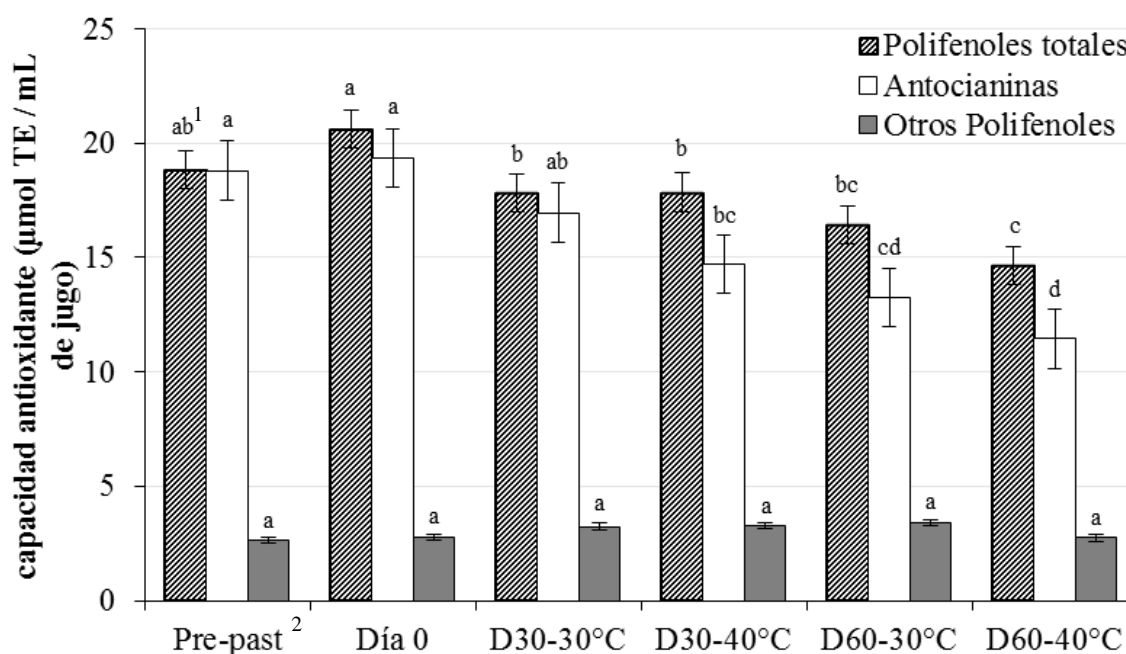


Figura 8. Capacidad antioxidante de tres fracciones químicas de jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) a diferentes condiciones de almacenamiento

¹Columnas del mismo color con la misma letra no presentan diferencia significativa. ²Pre-past=jugo pre pasteurizado. Day0=post-pasteurizado sin tratamiento de deterioro. D30-30°C jugo almacenado 30 días a 30°C. D30-40°C jugo almacenado 30 días a 40°C. D60-30°C jugo almacenado 60 días a 30°C. D60-40°C jugo almacenado 60 días a 40°C.

4. CONCLUSIONES

- La pasteurización tuvo un efecto de conservación significativo, previniendo la reducción en el contenido de polifenoles totales (12%) y la estabilidad de color (19%) del jugo de açai. Las antocianinas mostraron sensibilidad extrema al exponerlas a condiciones de almacenamiento.
- Las condiciones de almacenamiento a 40°C y 60 días afectaron negativamente el contenido de polifenoles, la capacidad antioxidante y la estabilidad de color en el jugo de açai.
- La pasteurización y condiciones de almacenamiento causaron hasta un 21% de polimerización de antocianinas.
- La Cianidina-3-glucósido estuvo presente en mayor concentración que cianidina-3-glucósido en el jugo de açai, y mostró más sensibilidad a la temperatura, más que al tiempo, en almacenamiento, especialmente a 40°C.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio aplicando las condiciones de almacenamiento a muestras pasteurizadas y no pasteurizadas para evaluar el efecto conservador de la pasteurización ante las diferentes condiciones de almacenamiento.
- Utilizar temperaturas de evaporación menor a los 60°C en la preparación de las fracciones y muestras en general, para no ocasionar degradación de antocianinas.
- Realizar un estudio utilizando muestras pasteurizadas, sin pasteurizadas, y agregar el factor del empaque (con y sin empaque tetra prisma), para evaluar el efecto conservador de la pasteurización por sí sola, del empaque por sí solo y el efecto de los dos métodos combinados.
- Realizar un análisis proximal a las muestras de jugo de açai para evaluar los cambios in la matriz del alimento.

6. LITERATURA CITADA

Del Pozo Insfran, D., C.H. Brenes y S.T. Talcott. 2004. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). American Chemical Society. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(6): 1539-1545.

Del Pozo Insfran, D., S. Percival y S.T. Talcott. 2006. Açai (*Euterpe oleracea* Mart) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycon Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. American Chemical Society. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(4): 1222-1229.

Galvano, F. L. La Fauci, G. Lazzarino, V. Fogliano, A. Ritieni, S. Ciappellano, N. Battistini y B. Tavazzi. 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. J. Nutrition and Biochemistry 15(1): 2-11.

Havlikova, L. y K. Mikova. 1985. Heat stability of anthocyanins. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 181(5): 427-432.

Heinrich M., D. Dhanji y I. Casselman. 2011. Açai(*Euterpe oleracea* Mart.)-A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. Phytochemistry letters 4(1): 10-21.

Jensen, G.S., X. Wu, K.M. Patterson, J. Barnes, S.G. Carter, L. Schrewitz, R. Beaman, J.R. Endres, y A. Schauss. 2008. In Vitro and In Vivo Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study. American Chemical Society Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(18): 8326-8333.

Jurd, L. y A. Asen. 1966. The formation of metal and co-pigment complexes of cyaniding-3-glucoside. Phytochemistry 5(6): 1263-1271.

Monagas, M., C. Gómez-Cordovés y B. Bartolomé. 2006. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L.during ageing in bottle. Food Chemistry 95(3): 405-412.

Oliveira P.A., I.G. De Silva, M.L. Souza, C.M. Furtado y R.F. Silva. 2011. In natura acai beverage: quality, pasteurization and acidification. Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Campinas 31(2): 502-507.

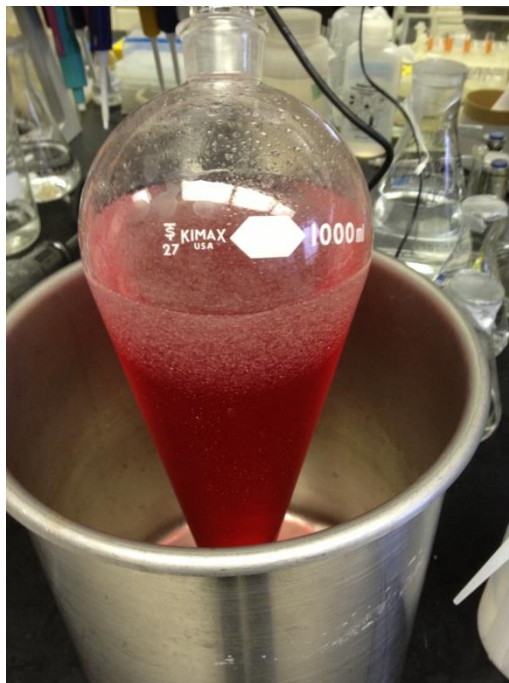
- Pacheco Palencia, L.A., C.E. Duncan y S.T. Talcott. 2009. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chemistry* 115(4): 1199-1205.
- Pacheco Palencia, L.A., P. Hawken y S.T. Talcott. 2007a. Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *ELSEVIER Food Chemistry* 105(1): 28-35.
- Pacheco Palencia, L.A., P. Hawken y S.T. Talcott. 2007b. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. *Food Research International* 40(5): 620-628.
- Pacheco Palencia, L.A., S. U. Mertens Talcott y S. T. Talcott. 2010. In vitro absorption and antiproliferative activities of monomeric and polymeric anthocyanin fractions from Açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chemistry* 119(3): 1071-1078.
- Pacheco Palencia, L.A., y S.T. Talcott. 2010. Chemical Stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. *Food Chemistry* 118(1): 17-25.
- Pereira K.S., F.L. Schmidt, A.M. Guaraldo, R.M. Franco, V.L. Dias y L.A. Passos. 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 72(2): 441-446.
- Rodrigues R.B., R. Lichtenthaler, B.F. Zimmermann, M. Papagiannopoulos, H. Fabricius, F. Marx, J.G. Maia y O. Almeida. 2006. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54(12): 4162-4167.
- Rodríguez Saona, L., M. Guisti y R. Wroslund. 1999. Colour and pigment stability of red radish and red fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science* 64(3): 451-456
- Rogez, H. 2000. Açai: preparo, composicao e melhoramento da conservacao. Tesis PhD. Pará-Brasil. Federal University of Pará-Chemical Engineering Department. 313p.
- Schauss, A.G. 2009-2011. Açai: An Extraordinary Antioxidant-Rich Palm Fruit. Tercera Edición. Washington, Estados Unidos. Biosocial Publications. 205 p.
- Schauss, A.G., X. Wu, R. Prior, B. Patel, D. Huang y J. Kababick. 2006. Phytochemical and nutrient composition of the freeze dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (açai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(22): 8598-8603.
- Singleton, V. y J. Rossi. 1965. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of enology and Viticulture* 16(3): 144-153.

- Spencer, J.P. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoides and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys* 423(1): 148-161.
- Talcott S.T. y L.R. Howard. 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(5): 2109-2115.
- Talcott, S.T. y J. Lee. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content on muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3186-3192
- Talcott, S.T., S.S Percival, J. Pittet Moore y C. Celoria. 2003. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food Chemistry* 51(4): 935-941.
- Ulbricht C., A. Bringham, D. Burke, D. Costa, N. Giese, R. Iovin, J.M. Grimes Serrano, S. Tanguay Colucci, W. Weissner y R. Windsor. 2012. An Evidence-Based Systematic Review of Acai (*Euterpe oleracea*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Informa Healthcare Journal of Dietary Supplements* 9(2): 128-147.
- Watson, R.R., V.R. Preedy. 2010. *Bioactive Food in promoting health*. Primera edición, London, UK. Elsevier Inc. 605pp.
- Wrolstad, R. E., R. W. Durst y J. Lee. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology* 16: 423-428.
- Yesayahu, P. y E.M. Clifton. 1994. *Food Analysis*. Tercera Edición. United States of America. Aspen Publishers Inc. 538 p.

7. ANEXOS



Anexo 1. Empaque tetra-prisma (Tetra-pak[®])



Anexo 2. Separación de fases en proceso de extracción con acetato de etilo.

Anexo 3. Resumen de ANDEVA de análisis realizados a tres fracciones químicas de jugo clarificado de açai (*Euterpe oleracea* Mart.).

Análisis	Fracción	Valor F	Probabilidad	R ²	Coefficiente de variación
Polifenoles solubles totales	PT ¹	12.86	0.0002	0.84	6.35
	ANT	10.58	0.0005	0.82	8.00
	OP	6.17	0.0047	0.72	7.88
Concentración de antocianinas	PT	30.95	<0.0001	0.93	9.51
	ANT	31.19	<0.0001	0.93	11.96
	OP	6.24	0.0045	0.72	26.63
Densidad de Color	PT	14.70	<0.0001	0.86	9.59
	ANT	21.63	<0.0001	0.90	10.53
	OP	1.56	0.2438	0.39	37.22
Matiz	PT	12.36	0.0002	0.84	5.80
	ANT	32.56	<0.0001	0.93	4.24
	OP	1.15	0.3853	0.32	30.33
Polimerización	PT	21.62	<0.0001	0.90	5.18
	ANT	133.77	<0.0001	0.98	2.24
	OP	24.24	<0.0001	0.91	26.87
ORAC	PT	7.21	0.0025	0.75	7.45
	ANT	12.71	0.0002	0.84	9.72
	OP	0.42	0.8291	0.15	29.13
HPLC	C3G ²	88.30	<0.0001	0.97	13.40
	C3R	48.09	<0.0001	0.95	14.50

¹PT=Polifenoles Totales ANT=Sólo antocianinas OP=Otros polifenoles.

²C3G=Cianidina-3-glucósido; C3R=Cianidina-3-runtinósido.